

**Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen - Institut
der Justus Liebig-Hochschule zu Giessen**

Direktor: Professor Dr. E. Roots

STANFORD-LANE MEDICAL LIBRARY
2395 SACRAMENTO ST.
SAN FRANCISCO 15, CALIF.

Versuche über die Konservierung von Schafblut für die Komplementbindungsreaktion

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Veterinär - Medizinischen Fakultät

der Justus Liebig-Hochschule zu Giessen

eingereicht von

Ulrich Reefke

Tierarzt aus Marienwerder (Westpr.)

GIESSEN 1954

**Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen - Institut
der Justus Liebig-Hochschule zu Giessen**

Direktor: Professor Dr. E. Roots

**Versuche über die
Konservierung von Schafblut
für die Komplementbindungsreaktion**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Veterinär - Medizinischen Fakultät

der Justus Liebig-Hochschule zu Giessen

eingereicht von

Ulrich Reefke

Tierarzt aus Marienwerder (Westpr.)

GIESSEN 1954

Mit Genehmigung der Veterinär - Medizinischen Fakultät Giessen

Dekan: Prof. Dr. H. Keller

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Roots

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 1954

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	5
B. Schrifttum	6
C. Eigene Untersuchungen	10
I. Planung	10
II. Methodik	12
a) Das Schafblut	12
b) Das Defibrinieren	12
c) Die bei der Behandlung des Blutes verwendeten Lösungen	12
1. Ringer-Locke-Lösung	12
2. Alsever-Lösung	13
3. Kochsalzlösung	13
4. Merthiolat-Zusatz	13
d) Die Auffanggefäße	13
e) Blutentnahme am lebenden Tier	13
f) Aufbewahrung des Blutes	14
g) Prüfung der Erythrozyten	14
III. Versuchsreihen	20
a) Vorversuch	20
b) Blut konserviert in Alsever-Lösung mit Mer- thiolat-Zusatz	24
D. Ergebnisse	29
E. Besprechung der Ergebnisse	30
F. Zusammenfassung	32
G. Literaturverzeichnis	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0161

A. Einleitung

Schon sehr bald nach Einführung der Komplementbindung durch Bordet und Gengou im Jahre 1901, besonders aber, nachdem Wassermann sie für die Diagnose der Lues ausbaute, war diese Reaktion in allen serologischen Laboratorien in Gebrauch. Heute spielt sie nicht nur eine Rolle bei der Erkennung bakterieller Krankheiten bei Tier und Mensch wie z.B. Rotz, Brucellose, Tuberkulose, Echinococcose u.a., sondern sie hat auch bei der Diagnose und Typenspezifizierung auf dem Gebiet der Viruskrankheiten eine grosse Bedeutung erlangt.

Weiter ging das Bemühen dahin, die bei der Komplementbindungsreaktion erforderlichen Komponenten zu normen und zu konservieren, wodurch neben der Zeitersparnis bei der Durchführung der Reaktion auch eine Beseitigung von Fehlerquellen erreicht werden sollte. Der hämolytische Ambozeptor und die spezifischen Antigene werden heute im allgemeinen in konservierter Form aufbewahrt und sind praktisch zumeist längere Zeit haltbar. Auch für das Komplement haben sich Konservierungsverfahren bewährt und werden im allgemeinen verwendet.

Die Blutkörperchenaufschwemmung unterliegt ebenfalls weitgehenden Schwankungen, so dass schon frühzeitig angestrebt wurde, die aus einer Blutentnahme stammenden Erythrozyten zu konservieren, um einheitliches Testmaterial zu erhalten. Dies erschien namentlich notwendig bei solchen Untersuchungen, bei denen die Titerhöhe im Verlauf einer Krankheit verfolgt werden sollte.

B. Schrifttum

Laubenheimer (1929) weist bereits darauf hin, dass die Zeitdauer des Schüttelns sowie dessen Intensität und endlich eine vollständige Entfernung des Fibrins aus dem Schüttelblut wesentliche Eigenschaften der Erythrozyten bestimmen, die bei der Komplementbindungsreaktion ins Gewicht fallen. Z.B. ist die Komplementmenge zur Lösung der Erythrozyten grösser bei länger geschütteltem als bei nur kurze Zeit geschütteltem Blut. Optimal wurde ein 10 Minuten langes Schütteln befunden, das gleichmässig stark und ohne Unterbrechung zu erfolgen hatte. Weiterhin wechseln die Erythrozytenmenge und der Hämoglobingehalt des Spenderblutes. Dies tritt namentlich dann in Erscheinung, wenn den Schafen in kürzeren Abständen wiederholt Blut entnommen wird. Hierbei werden auch, wie das Wassermann, Neisser und andere schon früher festgestellt haben, die Blutkörperchen fragil und verfallen leichter der Hämolyse.

In frischem Zustand bleiben die Erythrozyten bei etwa + 5°C 3 - 5 Tage für die Komplementbindungsreaktion verwendbar. Danach tritt bereits Hämolyse ein. Durch erneutes Auswaschen kann man Erythrozyten für ganz kurzfristige Verwendung wiedergewinnen. Die Frage der Konservierung der Erythrozyten für die Komplementbindungsreaktion ist auch heute noch offen. Früher haben viele Autoren empfohlen, die Schaf-Erythrozyten mit Formalin zu konservieren. Aus diesen An-

gaben ist oft nicht klar ersichtlich, in welchem Prozentsatz Formaldehyd zur Konservierung verwendet wurde; offenbar ist wiederholt das handelsübliche Formalin (40%ige Formaldehyd-Lösung) als Formaldehyd angegeben worden. Der Verlust der Lösung an Formaldehyd-Gehalt ist ebenfalls nur ausnahmsweise berücksichtigt. In gleicher Weise wird der Ausdruck "Blut" bzw. "Blutsuspension" verwendet ohne genaue Angabe, ob bei der Herstellung der Suspensionen von dem sehr unsicher abmessbaren konzentrierten Bodensatz nach der Waschung ausgegangen worden ist, oder ob als Ausgangsmaterial eine Aufschwemmung der Erythrozyten gedient hat, die durch Auffüllen auf das ursprüngliche Blutvolumen mit NaCl-Lösung erreicht wurde. Die nachfolgenden Schrifttumsangaben seien mit dieser Einschränkung wiedergegeben.

Die ersten, die solche Konservierung mit Formalin angaben, waren Armand-Delille und Launoy (1911). Sie versetzten 10 ccm gewaschene Erythrozyten mit 0,2 ccm einer 4%igen Formalin-Lösung und fanden die auf diese Art behandelten Erythrozyten nach 3-wöchiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur für die Komplementbindungsreaktion verwendbar. Bernstein und Kaliski (1912) bestätigten diese Angaben und empfahlen Formalinkonzentrationen von 1 : 300. Eisler (1912) stellte eine Verzögerung der Hämolyse nach Formalinbehandlung fest und erklärte dies mit Veränderungen der Blutkörperchen, die durch das Formalin bedingt waren. Eisenberg (1912)

weist darauf hin, dass durch den Formaldehyd-Zusatz die Erythrozyten überempfindlich gegenüber der Lösung sind. Pfeiler und Lossow (1913) setzten Formalin zu defibriniertem Blut (1 ccm 40%iges Formalin zu 800 ccm Blut) und erreichten eine Haltbarkeit von 4 Wochen. Bereits gewaschene Blutkörperchen sind weniger haltbar. Diese Angabe wird von Kranich und Löffler (1920) bestätigt mit der Einschränkung, dass manches Blut hierzu ungeeignet war. Sie empfehlen, die Blutkörperchenaufschwemmungen, die aus dem in defibriniertem Zustand mit Formalin behandelten Blut gewonnen werden, nach dem Waschen nochmals mit Formalin (1 ccm 1%ige Formalin-Lösung auf 10 ccm Blutkörperchenaufschwemmung) zu behandeln. Die Erythrozyten bleiben für 3 - 4 Tage gebrauchsfähig. Hohn (1924) schlägt vor, die Erythrozyten in Normosal aufzuschwemmen, wodurch sie 8 Tage haltbar werden. Jedoch darf Normosal nicht zur Verdünnung der übrigen Ingredientien verwendet werden. Sonnenschein (1925) bestätigt die Ergebnisse Hohns und gibt die Haltbarkeit auf 25 Tage an. Dold (1924), der vergleichende Untersuchungen über Aufschwemmungsflüssigkeiten durchführte, fand, dass Serum das beste Medium ist, um die Blutzellen am Leben zu erhalten. Die konservierende Fähigkeit der Suspensionen nimmt in nachstehender Reihenfolge zu: Physiologische Kochsalz-Lösung, Serumfiltrat, Normosal, Thyrode-Lösung, Ringer-Lösung und Serum. Die Untersuchungen erstreckten sich jedoch nur auf das morphologische Verhalten der Zellen. Aseptische Kautelen und gleichmäßige Kühlraumtemperatur von ca. $+ 5^{\circ}\text{C}$ sind für eine Aufbewahrung Voraus-

setzung. Hilgers und Wohlfel (1926) konnten in einer physiologischen Kochsalz-Lösung mit CaCl_2 die gewaschenen Erythrozyten mindestens 9 Tage gebrauchsfertig halten. Gelegentlich kamen unspezifische Hemmungen vor. Die Tendenz zur Nachlösung ist bei CaCl_2 -Zusatz geringer. Formalin in Konzentration von 1 : 700 lehnen sie als Konservierungsmittel ab, da bereits nach 24 Stunden starke Hämolyse auftrat. Freise (1927) wusch das Blut mit der oben angegebenen Kochsalz-Kalziumchlorid-Lösung und liess auf die Erythrozyten 20 Minuten Formalin einwirken. Danach wurde von dieser Salzlösung den mit Formalin behandelten Erythrozyten soviel zugesetzt, dass die Formalinkonzentration 1 : 5000 betrug. Das Blut bleibt eine Woche, notfalls 3 Wochen, für War brauchbar. Ginsburg und Selikowa (1934) empfehlen die Ringer-Löcke-Lösung ohne Glukose zum Auswaschen und zur Herstellung der Suspension der Erythrozyten. Als keimhemmendes Mittel wird 1% Trockenborsäure zugesetzt. Bis zu 20 Tagen waren die auf solche Art behandelten Erythrozyten frischen gleichwertig.

Wie eingangs bemerkt, ist die Verwendung gleicher Erythrozyten-Aufschwemmungen für eine längere Zeit erwünscht. Die übliche Defibrinierung des Blutes und Aufbewahrung der Erythrozyten im natürlichen Medium des Serums bewirkten eine nur kurze Haltbarkeit. Einzelne Versuche der Konservierung mit Formalin, Normosal, Kalziumchlorid und Borsäure haben keine allgemeine Anerkennung gefunden.

Es lag nahe, bei der Gewinnung und Aufbewahrung von Schafblut die Methoden anzuwenden, die in der Humanmedizin bei der Herstellung von Blutkonserven zum

Zwecke der Transfusion heute allgemein üblich sind. Hierüber liegen vereinzelt Mitteilungen bereits vor.

Nach Schliephake (1950) ist die Glukose-Citrat-Lösung allgemein als beste Stabilisator-Lösung anerkannt. Hierbei kommen 40,0 Glukose und 5,0 Natrium-Citrat auf 1000 aqua dest. Zur Fernhaltung von Keimen wird 0,02 Rivanol hinzugefügt. Traubenzucker stellt zwar einen guten Nährboden für Bakterien dar, bewirkt aber andererseits eine Verzögerung der Hämolyse, weil der grössere Stoffwechsel der Erythrozyten der Denaturierung der Membraneiweisse entgegentritt. (These nach Schürch).

Bukantz, Rein und Kent (1946) stellten fest, dass in gleichen Volumen "modifizierter Alseverscher Lösung" aufgefangenes Schafblut im Kühlschrank für wenigstens 10 Wochen gehalten werden kann, ohne eine Änderung in ihrer Löslichkeit durch Komplement und Ambozeptor erkennen zu lassen. Die "modifizierte Alseversche Lösung" hat folgende Zusammensetzung: In 1000 aqua bidestillata werden nacheinander gelöst: 20,5 Dextrose; 8,0 Natriumcitrat; 4,2 Natriumchlorid; 0,55 Zitronensäure.

Auch Spielmann und Schulz (1952) gehen bei ihren Untersuchungen nicht wie üblich von Schüttelblut aus, sondern benutzen steril in Alseverscher Lösung aufgefangenes Schafblut. Die Haltbarkeit geben sie mit 4 Wochen und mehr an und fügen hinzu, daß jede andere zur Blutkonservierung bestimmte Stabilisator-Lösung ebenso verwendbar sei.

C. Eigene Untersuchungen

1. Planung

Die Gewinnung und Konservierung von Schafblut zwecks Herstellung einer zum

Komplementbindungsversuch verwendbaren Erythrozyten-Aufschwemmung ist nach dem Schrifttum auf verschiedene Weise versucht worden. Der Hemmung der Blutgerinnung durch mechanisches Ausschlagen des Fibrins steht die des Auffangens in Citratlösung gegenüber. Die Konservierung der im Blutserum bzw. Citratplasma suspendierten Erythrozyten erfolgt durch Aufbewahrung bei niederen Temperaturen, gegebenenfalls unter Zufügen von Desinfektionsmitteln, wofür Merthiolat geeignet erschien. Ungeklärt scheint überdies, ob die Suspension der Erythrozyten im Serum (Dold) oder in einer Salzlösung (Ginsburg und Selikowa) die Erythrozyten besser für den genannten Zweck erhält. Der These von Schürch folgend sollte Traubenzucker als Hemmstoff für die Hämolyse ebenfalls beachtet werden. In allen Fällen mußten die Erythrozyten-Aufschwemmungen auf erkennbare Veränderungen und, soweit solche fehlen, auf ihre Verwendbarkeit im Komplementbindungsversuch geprüft werden. Um von vornherein die die Konservierbarkeit und auch den Ausfall der Komplementbindungsreaktion beeinflussenden Faktoren wie z.B. Alter und Ernährungszustand des blutspendenden Tieres, Alter der Erythrozyten, Dichte der Erythrozyten und Keimgehalt des aufgefundenen Blutes möglichst gleich zu gestalten, war es erforderlich, für die vergleichenden Untersuchungen im Vorversuch Blut von ein- und demselben Schaf zu nehmen. Die hierfür erforderliche grössere Menge Blut sollte während der Schlachtung gewonnen werden. Die Prüfung auf Verwendbarkeit der Erythrozyten sollte nach den aus Tabelle 1 ersichtlichen, unter "Methodik" näher erläuterten Gesichtspunkten

erfolgen. Die schliesslich gefundene brauchbarste Methode war dann an Blutproben zu kontrollieren, die unter den üblichen Verhältnissen der Praxis von lebenden Schafen gewonnen wurden. Besonders durch Vergleich in der Komplement- und Serumauswertung galt es festzustellen, ob sich Abweichungen gegenüber solchen Reaktionen ergeben, die mit frischen Erythrozyten angesetzt wurden.

II. Methodik

a) Das Schaffblut

Blutspender waren Schlachtschafe (zur Gewinnung grosser Mengen für vergleichende Untersuchungen) und Schafe einer Herde (Gewinnung von kleinen Proben).

b) Das Defibrinieren

Das Defibrinieren des Blutes erfolgte durch 10 Minuten langes, gleichmässiges Schütteln in mit Glasschrot versehenen Rollflaschen unter Verschluss mit Glasstopfen. Durch anschliessende Filtration durch einen sterilen, mit Mull versehenen Trichter wurden die im Serum suspendierten Erythrozyten von Fibrinresten befreit.

c) Die bei der Behandlung des Blutes verwendeten Lösungen

1) Ringer-Locke-Lösung mit Glukose: In 1000 ccm wurden nacheinander gelöst:

Natriumchlorid 8,0; Kaliumchlorid 0,2; Kalziumchlorid 0,2; Glukose 5,0.

- 2) Alsever-Lösung (durch Zugabe von Zitronensäure modifiziert; nach Bukantz, Rein und Kent): 20,5 Glukose, 8,0 Natriumcitrat, 4,2 Natriumchlorid, 0,55 Zitronensäure wurden nacheinander in 1000 frisch destilliertem Wasser gelöst.
- 3) Zum Waschen der Erythrozyten, zur Verdünnung des Serums, des Komplements und des Antigens, sowie bei der Herstellung des hämolytischen Systems wurde eine sterile 0,85%ige Kochsalzlösung verwandt.
- 4) Bei der Herstellung des Merthiolat-Zusatzes wurde von einer 1%igen Lösung in physiologischer Kochsalzlösung bzw. in Ringer-Locke-Lösung oder Alsever-Lösung ausgegangen.

d) Die Auffanggefäße

Die für die Konservierung verwendeten Glasgefäße waren stets aus Jenaer Glas. Vor der Blutentnahme wurden sie nach teilweiser Beschickung mit den angegebenen Salzlösungen 20 Minuten bei 1,2 atü im Autoklaven sterilisiert. Anschliessend erfolgte der Merthiolat-Zusatz. Zum Verschluss wurden durchstechbare Gummikappen verwandt.

e) Blutentnahme am lebenden Tier

Die Blutentnahme am lebenden Tier erfolgte durch Punktion der vena jugularis mit Kanülen aus V2A-Stahl. Das in scharfem Strahl austretende Blut wurde in den mit Alsever-Lösung beschickten Kölbchen aufgefangen. Zur Gewinnung auf geschlossenem Wege wurden die Auffanggefäße mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe nach Durchstechen

der Gummikappen evakuiert. Zur Leitung des Blutes verband ich zwei Kanülen durch einen etwa 10 cm langen, vorher sterilisierten Gummischlauch. Sobald das Blut floss, wurde die freie Kanüle durch die Gummikappe gestochen. Nach Erreichen einer bestimmten Marke wurde der Blutfluss unterbrochen. Auf eine gute Durchmischung mit der Stabilisator-Lösung wurde geachtet. Ausserdem gewann ich in manchen Fällen das Blut durch Aufziehen in eine graduierte Spritze und Ausspritzen in evakuierte Flaschen.

f) Aufbewahrung des Blutes

Die Aufbewahrung des konservierten Blutes erfolgte in einer Kühlzelle bei $+ 1^{\circ}\text{C}$.

g) Prüfung der Erythrozyten

Nach folgenden Gesichtspunkten wurden die konservierten Erythrozyten auf ihre Verwendbarkeit geprüft:

1) Aussehen der Erythrozytenschicht

Die Erythrozyten setzen sich, wenn das Blut einwandfrei gewonnen wurde, bald deutlich von der überstehenden Flüssigkeit ab. Nach einer gewissen Lagerzeit werden sie infolge Sauerstoffmangel dunkel. Beim Waschen zur Befreiung von Serum nehmen sie durch das Aufschütteln wieder hellrote Farbe an.

2) Farbe der Suspensionsflüssigkeit

Eventuell eingetretene Hämolyse ist an einer Rotfärbung der über den sedimentierten Erythrozyten liegenden Flüssigkeit zu erkennen.

3) Der Keimgehalt

Der Keimgehalt ist ein Merkmal der Haltbarkeit des Blutes. Sind auch nur wenige Keime bei der Gewinnung in die Blutprobe gelangt, so ist die Gefahr des Verderbens angesichts der günstigen Wachstumsbedingungen für die Bakterien stets gross. Die Keimzahlbestimmung nach der Plattenmethode sollte den Grad der Verunreinigung und damit zugleich die Wirksamkeit der Merthiolat-Zusätze aufzeigen.

Die Erstuntersuchung auf Keimgehalt des für die vergleichenden Untersuchungen von einem Schlachtschaf gewonnenen Blutes geschah nach folgendem Schema:

Durch Zugabe von 1 ccm steril. aqua dest. wurde 1 ccm Blut hämolysiert.

Hiervon wurden 0,5 ccm und 0,2 ccm auf je eine Petrischale gegeben, die gleich darauf mit Agar beschickt wurde. Nach Vermischung des Nährbodens mit dem Untersuchungsmaterial durch Umschwenken erfolgte nach Festwerden des Agars die Bebrütung (48 Stunden bei 37°C) und anschliessend die Auszählung der Keime.

Durch Multiplikation mit 4 bzw. mit 10 wurde der Bakteriengehalt von 1 ccm Blut errechnet. Bei den wiederholten Untersuchungen der Blutproben jeweils in Abständen von einer Woche wurden 0,2 ccm einer Blutlösung aus gleichen Teilen dest. Wassers und Blutkonserven sowie 0,1 ccm folgender Verdünnungsreihen zu Agarplatten verarbeitet.

	Verd. I	Verd. II	Verd. III	Verd. IV	Verd. V	Verd. VI
Grad der Verdünnung	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000
Blut + Zusatz	ccm 1	ccm 1	ccm 1	ccm 1	ccm 1	ccm 1
aqua dest.	ccm 9	phys. NaCl 9	9	9	9	9

Auf diese Weise hatte ich den Keimgehalt von 0,1; 0,01; 0,001; usw. ccm Blut bzw. Blutkonserve bestimmt. Ausgezählt wurde die Platte, in der die meisten noch zählbaren Kolonien aufgegangen waren. Die Umrechnung erfolgte durch Multiplikation mit dem Divisor.

4) Aussehen der konservierten Erythrozyten

Es war das Aussehen der konservierten Erythrozyten mit dem der frischen Erythrozyten nach 3maligem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung zu vergleichen.

5) Prüfung der Aufschwemmungsflüssigkeit

Die Prüfung der Aufschwemmungsflüssigkeit nach dem jeweiligen Zentrifugieren kommt einer groben Resistenzprüfung gleich. Das Aufschütteln und Aufschwemmen in einer physiologischen Kochsalzlösung, die, wie vorher gesagt, keineswegs gute konservierende Eigenschaften besitzt, wird von Erythrozyten, die in ihrer Struk-

tur gelitten haben, weniger gut vertragen. Sie verfallen eher der Hämolyse. Die Unversehrtheit der roten Blutkörperchen ist von Wichtigkeit, da intakte Erythrozyten im allgemeinen das Komplement nicht beeinflussen, während die Stromata der hämolysierten Erythrozyten wie andere Körperzellen antikomplementär wirken.

6) Komplementbindungsreaktion

Die in der Komplementbindungsreaktion verwandten bangpositiven Seren wiesen folgenden Agglutinationstiter auf:

Serum I	1:400 ++++; 1:800 ++
II	1:200 ++++; 1:400 +++
III	1:800 ++++
IV	1:800 ++++
VI	1:800 ++++
VII	1:25 ++++; 1:100 ++
VIII	1:25 ++++; 1: 50 +++; 1:100 +++
IX	1:400 ++++; 1:800 +++
X	1:100 ++++; 1:200 +++
XIII	negatives Serum

Die Seren waren durch Zugabe von Phenol (5%ig)-Kochsalz (0,85%)-Lösung im Verhältnis 1:10 konserviert worden.

Als Komplement diente Meerschweinchenserum, das nach den Angaben von W i t t e (1933) durch Zusatz einer gleichen Menge einer 10%igen wässrigen Kaliumsulfat-Lösung, die 4% Borsäure enthält, konserviert war. Das konservierte Komplement

wurde 1:10 verdünnt. Auf Serum berechnet betrug die Verdünnung 1:20. Als Arbeitsdosis bei der Serumauswertung verwendete ich das 1 1/4-fache der in der Komplementauswertung festgestellten Minimaldosis.

Die Antigenlösung wurde nach L e r c h e und R o o t s (1947) aus standardisiertem Brucellose- (Abortus-Bang) Trockenantigen vorschriftsmässig hergestellt.

Die Minimaldosis dieser Antigenlösung beträgt beim Durchführen der Komplementbindungsversuche in halben Dosen 0,00125 ccm. Die Gebrauchsdosis (die vierfache Minimaldosis) liegt demnach bei 0,005 ccm, die sogenannte unterbindende Dosis bei 0,25 ccm. Wird dieser Antigenlösung physiologische Kochsalz-Lösung im Verhältnis 1:100 hinzugesetzt, dann erhält man eine 1/10ige Verdünnung, deren jede 0,5 ccm 0,005 ccm (die Gebrauchsdosis) Antigenlösung enthält, wie es bei laufenden Untersuchungen benötigt wird.

Bei der Prüfung der in dieser Anweisung enthaltenen Angaben wurden folgende Ergebnisse erzielt: Das Antigen zeigte in der Menge von 0,1 ohne Antiserum keine Eigenhemmung, es wirkte also in dieser Konzentration nicht antikomplementär. Für die Auswertung des Antigens wurden 3 Antisera verwandt, die einen Komplementbindungstiter von 1:640 (Serum A), 1: 320 (Serum B) und 1: 1280 (Serum C) aufwiesen. Die Arbeitsdosis ergibt sich aus der 4-fachen Minimaldosis, d. h. für Serum A 1: 160, Serum B 1: 80 und Serum C 1: 320. Die mit diesen Serum-Arbeitsverdünnungen vorgenommene Antigenauswertung ergab bei Serum A und B eine vollständige oder nahezu vollständige Hemmung der Hämolyse bei 0,0005 ccm Serum, bei Serum C bei

0,001 ccm. Das Antigen erwies sich somit als etwas stärker komplementbindungs-
wirksam als in der Anweisung angegeben. Bei den weiteren Untersuchungen legte ich
jedoch die oben aufgeführten Daten zugrunde, d.h. es kam das 1:100 verdünnte Anti-
gen in der Menge von 0,5 zur Anwendung.

Der hämolytische Ambozeptor (Behring-Werke Marburg) hatte lt. Angabe einen Titer
1:4000. Er kam in der vierfachen Minimaldosis = 1:1000 als Arbeitsdosis zur An-
wendung.

Im hämolytischen System (HS) wurde eine 4%-ige Blutsuspension verwandt, wobei von
dem zur Zentrifugation gelangenden Blutvolumen ausgegangen wurde. Hierdurch wur-
den Unsicherheiten vermieden, die in dem entsprechend der Zentrifugenleistung un-
gleich konzentrierten Bodensatz sowie in der Schwierigkeit des Pipettierens des
dickflüssigen Erythrozytenbreies zu suchen waren.

Ich markierte daher mit Fettstift die in das Zentrifugengläschen gegebene Blut-
menge und füllte nach dreimaligem Waschen bis zu dieser Marke mit physiologischer
Kochsalzlösung auf. War das Blut zu gleichen Teilen mit einer Salzlösung ver-
setzt, so wurde eine 8%ige Blutsuspension zur Herstellung des hämolytischen Systems
verwandt, um eine gleiche Dichte zu erreichen.

Die zur Untersuchung verwandten Sera wurden in der jeweiligen Arbeitsverdünnung vor
dem Komplementbindungsversuch 1/2 Stunde bei 56-58°C im Wasserbad inaktiviert. Für
die Durchführung der Reaktionen verwendete ich sogenannte "halbe Dosen", so dass
je Komponente 0,5 ccm benötigt wurden. Die Bedingungen bezüglich Wasserbad,

Dauer der Komplementbindungsphase und "Sensibilisierung" (Erwärmung auf 37°C) des hämolytischen Systems waren bei allen zum Vergleich kommenden Blutsuspensionen stets gleich.

Für die Beurteilung der Ergebnisse der Reaktionen war folgendes Schema massgebend:

Vollständige Hemmung der Hämolyse	= 4
75%ige Hemmung oder mehr	= 3
50%ige Hemmung oder mehr	= 2
25%ige Hemmung oder mehr	= 1
fast vollständige Hämolyse	= 1/2
vollständige Hämolyse	= -

III. Versuchsreihen

a) Vorversuch

Das während der Schlachtung eines Schafes aufgefangene, z.T. defibrinierte

Blut wurde in Mengen von je 50 ccm in 100 ccm fassende, z.T. mit Salzlösungen beschickte Kölbchen gegeben, die mit Gummikappen verschlossen wurden. Der Merthiolat-Zusatz bezieht sich auf die gesamte Flüssigkeitsmenge. Nachstehende Übersicht gibt den genauen Inhalt der Kölbchen an:

Gruppe I

Kölbchen a 50 ccm defibr. Blut

" b 50 ccm defibr. Blut + Merthiolat 1:5000

" c 50 ccm defibr. Blut + Merthiolat 1:2500

Gruppe II

- Kölbchen a 50 ccm R-L-GI + 50 ccm defibr. Blut
- " b 50 ccm R-L-GI + Merthiolat 1:5000 +
50 ccm defibr. Blut
- " c 50 ccm R-L-GI + Merthiolat 1:2500 +
50 ccm defibr. Blut

R-L-GI bedeutet: Ringer-Locke-Lösung mit Glukose.

Gruppe III

Das frisch aufgefangene Blut wurde nur ganz leicht geschüttelt.

- Kölbchen a 50 ccm Alsever + 50 ccm Blut
- " b 50 ccm Alsever + Merthiolat 1:5000 +
50 ccm Blut
- " c 50 ccm Alsever + Merthiolat 1:2500 +
50 ccm Blut

Zur Prüfung wurden die Blutproben einer Gruppe gleichzeitig

herangezogen. Das jeweilige Alter ist aus Tabelle I ersichtlich.

Zum Vergleich diente defibriniertes Frischblut.

b) Blut konserviert in Alsever-Lösung mit Merthiolat-Zusatz

Aus der folgenden Übersicht sind die näheren Einzelheiten zu erkennen.

Tabelle 2

Be- zeich- nung der Kölb- chen	Tag der Blut- gewin- nung	Art der Ge- win- nung	Inhalt der Kölbchen vor der Be- scheidung mit Blut	Tag der Prü- fung	Alter der Ery- thro- zyten	Aussehen der Blutkonserven. Verhalten der Erythrozyten beim Waschen
1	4.6.	a	50 ccm Alse- ver + Merthiolat 1:2500	28.6.	24	Erythrozyten dunkelrot,
2	4.6	b	wie oben	28.6.	24	scharf abge-
3	4.6.	b	wie oben	28.6.	24	setzt.
4	4.6.	b	wie oben	28.6.	24	überstand
7	10.6.	b	20 ccm Alse- ver + Merthio- lat 1:2500	1.7.	21	gelblich tingiert.
8	10.6.	b	wie oben	1.7.	21	Erythrozyten
9	10.6.	c	wie oben	1.7.	21	zeigen beim
10	10.6.	b	wie oben	1.7.	21	Waschen
11	10.6.	b	wie oben	1.7.	21	keine Hämolyse.

Zu Art der Gewinnung:

- Das Blut fließt im Strahl in das Auffanggefäß.
- Das Blut fließt durch einen Schlauch in das Auffanggefäß.
- Das Blut wird in eine Spritze aufgezogen, gleich darauf in das eva-
kuierte Auffanggefäß ausgespritzt.

Die nachfolgenden Tabellen geben Aufschluss über den Ausfall der Komplementauswertung und Komplementbindungsreaktion. Die Bezeichnung des hämolytischen Systems mit HS 1 - 4 und 7 - 11 besagt, dass die in den entsprechend bezifferten Kölbchen konservierten Erythrozyten Verwendung fanden.

Tabelle 3

Komplementauswertung

Tag der Untersuchung: 28.6.

Komplement	Antigen	phys. NaCl	HS (1-5)	HS 1	HS 2	HS 3	HS 4	HS 5 ⁺⁺
1:20	1:200							
0,3	0,5	0,7	1,0	-	-	-	-	-
0,25	0,5	0,75	1,0	- *	-	-	-	-
0,23	0,5	0,77	1,0	1/2	- *	-	-	-
0,2	0,5	0,8	1,0	1	1/2	- *	-	-
0,18	0,5	0,82	1,0	2	1/2	1/2	- *	-
0,15	0,5	0,85	1,0	3	1	1/2	1/2	- *
0,13	0,5	0,87	1,0	3	2	2	1/2	1
0,1	0,5	0,9	1,0	4	4	3	2	3

Minimaldosis liegt bei *

HS 1: Minimaldosis wurde das 1 1/4-fache der Minimaldosis verwandt.

** Für das HS 5 wurde defibriniertes Blut vom 26.6. verwandt.

Tabelle 4

Komplementbindungsreaktion

Tag der Untersuchung: 28.6.

Ver- dün- nung	Se- rum	Kom- ple- ment + NaCl	An- ti- gen 1:100	HS (1- 3)	HS 1					HS 2					HS 3				
					Serien Nr.					Serien Nr.					Serien Nr.				
					I	II	III	IV	VI	I	II	III	IV	VI	I	II	III	IV	VI
1: 160	0,5	0,5	0,5	1,0	4	4	4	4	3	4	3	4	3	3	4	4	4	3	4
1: 320	0,5	0,5	0,5	1,0	3	4	4	1	3	3	3	4	1	3	4	3	4	1	3
1: 640	0,5	0,5	0,5	1,0	1/2	-	4	-	2	1/2	-	4	-	-	1	-	4	-	-
1: 1280	0,5	0,5	0,5	1,0	1/2	-	4	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-
1:2560	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:5120	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ver- dün- nung	Se- rum	Kom- ple- ment + NaCl	An- ti- gen 1:100	HS (4- 5)	HS 4					HS 5				
					Serien Nr.					Serien Nr.				
					I	II	III	IV	VI	I	II	III	IV	VI
1: 160	0,5	0,5	0,5	1,0	3	4	4	3	4	4	4	4	3	3
1: 320	0,5	0,5	0,5	1,0	3	3	4	2	3	4	4	4	2	2
1: 640	0,5	0,5	0,5	1,0	1/2	-	4	-	-	1/2	1/2	4	-	2
1:1280	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	3	-	-	-	-	4	-	-
1:2560	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:5120	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(* In 0,5 ccm (Komplement + NaCl) ist die jeweilige Arbeitsdosis enthalten.

Tabelle 5

Komplementauswertung

Tag der Untersuchung: 1.7.

Komplement	Antigen	phys. NaCl	HS (7-12)	HS 7	HS 8	HS 9	HS 10	HS 11	HS 12 (**)
1:20	1:100	-	12)						
0,3	0,5	0,7	1,0	-	-	-	-	-	-
0,25	0,5	0,75	1,0	-	-	-	-	-	-
0,23	0,5	0,77	1,0	-	-	- *	-	-	-
0,2	0,5	0,8	1,0	- *	- *	1/2	-	-	-
0,18	0,5	0,82	1,0	1	1/2	2	-	-	- *
0,15	0,5	0,85	1,0	2	1	3	- x	- *	1
0,13	0,5	0,87	1,0	2	2	3	2	2	2
0,1	0,5	0,9	1,0	4	4	4	4	3	4

Minimaldosis liegt bei *

Als Arbeitsdosis wurde das 1 1/4-fache der Minimaldosis verwandt.

(**) Für das HS 12 wurde defibriniertes Blut vom 26.6. verwandt.

Tabelle 6

Komplementbindungsreaktion

Tag der Untersuchung: 1.7.

Verdün- nung	Se- rum	Kom- ple- ment + NaCl	An- ti- gen 1:100	HS (7- 9)	HS 7					HS 8					HS 9				
					Seren-Nr.					Seren Nr.					Seren Nr.				
					I	II	III	IV	VI	I	II	III	IV	VI	I	II	III	IV	VI
1: 160	0,5	0,5	0,5	1,0	4	4	4	3	3	3	3	3	2	2	4	4	4	4	4
1: 320	0,5	0,5	0,5	1,0	3	4	4	1	3	2	2	3	1	2	4	3	4	1	3
1: 640	0,5	0,5	0,5	1,0	1	1/2	4	-	2	2	1	2	-	1	1	-	4	-	1
1:1280	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-
1:2560	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:5120	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ver- dün- nung	Se- rum	Kom- ple- ment + NaCl	An- ti- gen 1:100	HS (10- 12)	HS 10					HS 11					HS 12				
					Seren Nr.					Seren Nr.					Seren Nr.				
					I	II	III	IV	VI	I	II	III	IV	VI	I	II	III	IV	VI
1: 160	0,5	0,5	0,5	1,0	4	3	4	3	3	4	3	4	3	3	4	4	4	4	4
1: 320	0,5	0,5	0,5	1,0	2	3	3	2	2	2	3	4	3	3	3	3	4	3	3
1: 640	0,5	0,5	0,5	1,0	-	1/2	3	-	-	-	1/2	4	-	-	-	3	3	-	3
1:1280	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	3	-	-	-	-	4	-	-	-	-	3	-	-
1:2560	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:5120	0,5	0,5	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(* In 0,5 ccm (Komplement + NaCl) ist die jeweilige Arbeitsdosis enthalten.

D. Ergebnisse

Die aus den vorstehenden Tabellen ersichtlichen Ergebnisse sind im wesentlichen folgende:

- 1) Hämolyse zeigt sich bei dem in defibriniertem Zustand aufbewahrten Blut bereits nach 8 Tagen. Bei der wiederholten Untersuchung nach weiteren 6 Tagen (Blut ist 14 Tage alt) zeigt sich eine deutliche Zunahme der Hämolyse, die bei der nächsten Untersuchung (Blut ist 21 Tage alt) so stark ist, dass die Erythrozyten beim Waschen vollkommen gelöst werden. Sie scheiden für weitere Untersuchungen aus. Demgegenüber zeigen sich bei dem in Alseverlösung aufgefangenen Blut noch nach 30 Tagen keine deutlich wahrnehmbaren hämolytischen Verfärbungen der über den sedimentierten Erythrozyten stehenden Flüssigkeit. Diese treten auch nicht beim Waschen der Erythrozyten auf. Bei der wiederholten Untersuchung 20 Tage später (Blut ist 50 Tage alt) zeigt sich bei dem ohne Merthiolat-Zusatz aufbewahrten Blut ein hämolytischer Saum. Diese Erythrozyten hämolysieren beim Waschen. Dagegen weisen die unter Merthiolat-Zusatz aufgehobenen Blutproben nur ganz leichte Verfärbungen der überstehenden Flüssigkeit auf.
- 2) Der Keimgehalt ist besonders stark bei dem ohne Merthiolat-Zusatz konservierten Blut. Bei der wiederholten Untersuchung der einzelnen Blutproben wird im allgemeinen eine Zunahme um eine Dezimalstelle festgestellt.

- 3) Bei der Feststellung der Minimaldosis in der Komplementauswertung ergeben sich geringe Schwankungen.
- 4) In der Komplementbindungsreaktion ergibt sich bei den wiederholten Untersuchungen bis auf geringe Abweichungen Übereinstimmung mit den mit Frischblut angestellten Reaktionen. Das Absinken des Titers wird sowohl bei den mit konservierten als auch mit frischen Erythrozyten angestellten Reaktionen festgestellt.
- 5) Die von 9 Weideschafen in Alsever-Lösung mit Merthiolat-Zusatz aufgefangenen Blutproben zeigen bei Prüfung nach 24 bzw. 21 Tagen keine hämolytischen Verfärbungen, weder im Aufbewahrungsgefäß noch beim Waschen. Bei der Feststellung der Minimaldosis und im Komplementbindungsversuch ergeben sich geringe Unterschiede gegenüber mit Frischblut angestellten Reaktionen (s. Tabellen 2 - 6).

E. Besprechung der Ergebnisse

Bei den vergleichenden Untersuchungen der Versuchsreihe a) hat sich gezeigt, dass in Alsever-Lösung aufgefangenes Schafblut für die Komplementbindungsreaktion erheblich länger (3 - 4 Wochen und mehr) brauchbar bleibt als durch Schütteln defibriniertes, sonst unter gleichen Bedingungen aufbewahrtes Blut. Ein Zusatz von Merthiolat hemmt zwar die Keimvermehrung, bewirkt dadurch jedoch keine längere Haltbarkeit des durch Schütteln defibri-

nierten Blutes. Eine solche wird auch nicht durch Zugabe von Ringer-Locke-Lösung mit Glukose erreicht. Die längere Haltbarkeit der in Alsever-Lösung konservierten Erythrozyten ist demnach auf die weit schonendere Behandlung bei der Gewinnung zurückzuführen. Vor allem stellt das 10 Minuten lange Schütteln für die Erythrozyten ein nicht zu unterschätzendes Trauma dar, wodurch sie fragiler werden und eher der Hämolyse verfallen. Das durch Schütteln defibrinierte Blut läßt sich nach 8 und auch 14 Tagen zwar in der Komplementbindungsreaktion noch verwenden, und es ergeben sich nur geringe Unterschiede gegenüber mit frischen Erythrozyten angestellten Reaktionen; die Beurteilung ist jedoch deswegen schwierig, weil die 8 Tage und älteren Erythrozyten eine nicht mehr so stark färbende Kraft wie frische Erythrozyten haben. Dagegen zeigen die in Alsever-Lösung konservierten Erythrozyten bei Verwendung im hämolytischen System nach 4 Wochen noch das gleiche leuchtende Rot wie frische Erythrozyten. Bei der wiederholten Beurteilung von Reaktionen nach mehrstündigem Stehen zeigt sich, dass die konservierten Erythrozyten eher einer Nachlösung verfallen als die frischen. Während bei Letzteren die über den sedimentierten Erythrozyten stehende Flüssigkeit klar und annähernd farblos ist, ist sie bei Ersteren gelb-rötlich bis rötlich tingiert.

Die in der Versuchsreihe b) sich ergebenden Unterschiede sind neben Pipettierfehlern hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass die im hämoly-

tischen System verwandten Blutsuspensionen nicht die gleiche Dichte aufwiesen. Einmal schwankt bei den einzelnen Schafen der Erythrozyten-Gehalt pro cmm, zum anderen kann bei der Gewinnung des Schafblutes die in die Stabilisatorlösung zufließende Blutmenge nicht immer genau abgemessen werden. Dadurch wird das gewünschte Verhältnis von 1 : 1 (Alsever-Lösung : Blutmenge) nicht erreicht, wodurch die Herstellung gleichdichter Blutsuspensionen erschwert wird, wenn hierbei von dem zur Zentrifugation gelangenden Blutvolumen (Blut + Alsever-Lösung) ausgegangen wird. Dieser ungleichen Dichte der Blutsuspensionen im hämolytischen System wird zwar durch die Komplementauswertung Rechnung getragen; dennoch treten besonders bei vergleichenden Untersuchungen Unterschiede zu Tage. Geht man dagegen vom Bodensatz aus, so bereitet die Herstellung gleichdichter Suspensionen weniger grosse Schwierigkeiten.

F. Zusammenfassung

Die in der Humanmedizin üblichen Methoden der Blutkonservierung in natriumcitrathaltigen Lösungen lassen sich auch bei der Konservierung von Schafblut zur Verwendung in der Komplementbindungsreaktion anwenden. So erweist sich in medifizierter Alsever-Lösung aufgefangenes Schafblut nach 3 - 4 Wochen durchaus brauchbar für die Verwendung im hämolytischen System. Merthiolat, das als keimhemmendes Mittel dem konservierten Blut zugesetzt wird, bewirkt eine längere Haltbarkeit und hat keinen störenden Einfluss. Wichtig ist es, stets gleichdich-

te Blutsuspensionen zu verwenden. In der Schwierigkeit der Herstellung solcher Aufschwemmungen liegt vor allem der Grund für den nicht immer gleichen Ausfall der Komplementbindungsreaktion.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. R o o t s für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung danken.

Ferner sage ich Herrn Prof. Dr. H a u p t für seine stete Hilfsbereitschaft meinen aufrichtigen Dank.

6. Literaturverzeichnis

=====

- 1) Armand-Delille und Launoy: L'emploi des hématies stabilisées par le formol dans la réaction de Wassermann.
Presse med. 1912 Nr. 89 S. 901 Ref. Zbl. Bkt.
Ref. 56 (1913) S. 430.
- 2) Bernstein und Kaliski: Die Verwendung von formalinisierten Schafblutkörperchen im Komplementbindungsversuch.
Ztschrft. Immun. Fschg. 13 (1912) S. 490.
- 3) Braun (Melsungen): Einrichtung und Betrieb von Blutbanken mit dem Transfusionsbesteck nach Moser/Braun und dem B-Gerät der Firma B. Braun, Melsungen. S. 4.
- 4) Bukantz, Rein und Kent: Preservation of sheeps blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction.
Journal of Labor and Clin. Med. 31 (1946) S. 394.
- 5) Dold: Ein neues Verfahren zur Konservierung (Überlebenshaltung) von Blutzellen (Leukozyten, Erythrozyten, Blutplättchen) und anderen Körperzellen. Klin. Wochenschrft. 3 (1924) S. 629.

- 6) Eisenberg: Über die Formaldehydhämolyse. Biochemische Ztschrift. 45 (1912) S. 303; Ref. Zbl. Bkt. Ref. 56 S. 549.
- 7) Eisler: Über den Einfluss des Formalins auf rote Blutkörperchen. Zbl. Bkt. Orig. 65 (1912) S. 138
- 8) Freise: Die Entkeimung und Konservierung infizierten Hammelblutes zum Gebrauch für die Wassermann-Reaktion. Zbl. Bkt. Orig. 104 (1927).
- 9) Ginsburg und Selikowa: Ein Verfahren zur Konservierung der Hammelerythrozyten für die Komplementbindungsreaktion. Ztschrift. Immun.-Forsch. 83 (1934) S. 157.
- 10) Hilgers und Wohlfeil: Kalziumchlorid als Konservierungsmittel der Hammelbluterythrozyten. Ztschrift. Immun.-Forsch. 47 (1926) S. 337.
- 11) Hohn: Die Konservierung von Hammelblut für die WaR durch Normosal. MMW 71 (1924) S. 1707.
- 12) Kranich und Löffler: Vereinfachungen und Neuerungen auf dem Gebiete der Blutuntersuchungen bei Rotz. DTW. 28 (1920) S. 479.
- 13) Lange: Die Lebensdauer der für die WaR benötigten Reagentien. Ztschrift. Immun.-Forsch. 26 (1917) S. 396.

- 14) Lerche und Roots: Vereinheitlichung serologischer Untersuchungs-
methoden für die Brucellose=Diagnose durch An-
wendung eines standardisierten Trockenantigens.
TU. 1948 S. 106.
- 15) Pfeiler und Lossow: Die Verwendung formalisierter Blutkörperchen
im Komplementbindungsversuch. Mitt.d.Kaiser
Wilhelm-Instituts für Landwirtschaft zu Bromberg.
Ref.Zbl. Bkt.Ref.58 (1913) S. 398.
- 16) Schliephake: Messungen der Hämolyse in Blutkonserven. Diss.
Marburg 1950.
- 17) Sonnenschein: Normosal-Hammelblutkörperchen bei der WaR.
DMW 51 (1925) S. 1276.
- 18) Spielmann und Schulz: Über quantitative Komplementbindungsreaktion
(WaR) zur Syphilisdiagnose. Ztschrft. Hyg.
134 (1952) S. 236.
- 19) Witte, J.: Über die Konservierung des Komplementes in
hypertonischen Salzlösungen. Berl. Tierärztl.
Wschrft.49 (1933) S. 180.

Lebenslauf

Ich, Ulrich Reefke, wurde am 18.5.1923 als zweiter Sohn des Lehrers Wilhelm Reefke und seiner Ehefrau Erika, geb. Parpart, zu Marienwerder (Westpr.) geboren. Nach dem Besuch der Grundschule in Marienwerder und Rehhof (Westpr.) wurde ich Schüler der Oberschule für Jungen zu Marienwerder, die ich bis zu meiner Einberufung zur Wehrmacht am 1.12.1940, zuletzt als Schüler der Klasse 8, besuchte. Beim Abgang von der Schule wurde mir die Reife zuerkannt. Nach Wehrdienst und russischer Gefangenschaft konnte ich im WS 47/48 mein Studium wieder aufnehmen, das ich im WS 43/44 während eines Lazarettaufenthaltes in Giessen begonnen hatte. Am 15.10.1949 legte ich an der Justus Liebig-Hochschule die tierärztliche Vorprüfung, am 17.9.1952 die tierärztliche Prüfung ab. Nach Ableistung der Praktikantenzeit an den Veterinärkliniken in Giessen erhielt ich am 1.6.1953 die Approbation.

